# QUANTITATIV HISTOMORPHOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN MITTELS PUNKTZÄHLVERFAHREN AM ORTHOTOPEN HODEN DES HUNDES BEI EXPERIMENTELL UNILATERALEM KRYPTORCHISMUS MIT UND OHNE HCG-BEHANDLUNG

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät

der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von

DIETER TITTERT
aus Duisburg

BONN 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523712_0059

# QUANTITATIV HISTOMORPHOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN MITTELS PUNKTZÄHLVERFAHREN AM ORTHOTOPEN HODEN DES HUNDES BEI EXPERIMENTELL UNILATERALEM KRYPTORCHISMUS MIT UND OHNE HCG-BEHANDLUNG

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät

der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von

DIETER TITTERT
aus Duisburg

BONN 1976

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. L. Weißbach

2. Gutachter: Prof. Dr. S. Kowalewski

Aus der Urologischen-Universitätsklinik Bonn
Direktor: Prof. Dr. W. Vahlensieck

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: Rudolf Stehle GmbH & Co. KG, Düsseldorf

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| A | Problemstellung | 5 |
| B | Überblick über den Ablauf, die Kinetik und die Stadieneinteilung der normalen Spermatogenese des Hundes | 7 |
| C | Versuchsanordnung | 11 |
| | 1. Material | 11 |
| | I. Versuchsserie 1 (postpuberale Tiere ohne HCG-Therapie) | 11 |
| | II. Versuchsserie 2 (postpuberale Tiere mit HCG-Therapie) | 11 |
| | 2. Versuchsablauf | 12 |
| | a) Narkose | 12 |
| | b) Erzeugung des unilateralen Kryptorchismus und Dauer des kryptorchen Zustands | 12 |
| | c) Kastration | 13 |
| | d) HCG-Behandlung | 13 |
| | 3. Histologische Technik | 14 |
| D | Ermittlung und statistische Bearbeitung der Ergebnisse | 15 |
| | 1. Auswertungsmethoden | 15 |
| | a) Meßkriterien | 15 |
| | b) Ermittlung der relativen Stadienfrequenz | 15 |
| | c) Zählung der Kerne aller Spermatogenesezellen pro Tubulus unter Berücksichtigung der Stadieneinteilung | 17 |
| | d) Histometrische Bestimmungen mit Hilfe der Treffermethode | 18 |
| | I. Prinzip der Treffermethode | 18 |
| | II. Bestimmung der Tubulusfläche | 22 |
| | III. Bestimmung der Kernfläche | 22 |

Seite

c) Statistische Methodik 23

2. Ergebnisse und Statistik 26

a) Relative Stdienfrequenz 26

b) Anzahl der Kerne aller Spermatogenese-zellen pro Tubulusfläche 30

c) Ergebnisse der Untersuchungen mit Hilfe der Treffermethode 34

I. Tubulusfläche 34

II. Kernfläche 43

E Diskussion 47

F Zusammenfassung 54

G Literaturverzeichnis 55

H Lebenslauf

## A Problemstellung

Durch zahlreiche Veröffentlichungen und experimentelle Untersuchungen ist bekannt, daß bei unilateralem Kryptorchismus das Keimepithel des dystopen Hodens degenerativ verändert wird.
Aber auch am spontan descendierten Hoden wurden Alterationen beobachtet, die von NELSON (1953), BRAREN (1959), BAY, MATTHEAS und SCHIRREN (1968), HECKER (1971 u. 72), HÖSLI (1971) und HECKER, HIENZ und MENGEL (1972) beschrieben wurden.
Diese durch einseitigen Hodenhochstand hervorgerufenen Schäden können zu einer Beeinträchtigung der Zeugungsfähigkeit führen. So haben SCOTT (1961), DÖPFMER und NIENABER (1964), SCHIRREN und STEENO (1966), STRAUB (1969) und KNORR (1973) jeweils unterschiedlich große Patientengruppen mit einseitiger Hodenfehllage untersucht. Alle Befunde ergaben, daß etwa 2/3 der untersuchten Männer nicht oder nur eingeschränkt zeugungsfähig waren.

Für die Beantwortung der sich daraus ergebenden Frage nach der Ursache der vorliegenden Fertilitätsstörung war die Beobachtung von SHIRAI (1966) richtungsweisend. Er stellte bei einem 23 Jahre alten Mann mit erworbenem unilateralen Kryptorchismus umfangreiche degenerative Veränderungen sowohl im kryptorchen als auch im normal descendierten, skrotalen Hoden fest.
Die daraufhin von ihm (1966) durchgeführten experimentellen Untersuchungen bei Tieren mit unilateralem Kryptorchismus (er verlagerte bei Hunden einen Hoden in die Bauchhöhle) führten zu der Schlußfolgerung, daß die Veränderungen der orthotopen Keimdrüse durch die Degeneration des kryptorchen Organs auf noch unbekanntem Wege induziert werden, da sich die Schäden am skrotalen Hoden nach rechtzeitiger Rückverlagerung des kryptorchen in das Skrotum als reversibel erwiesen.
Aufbauend auf den Arbeiten von SHIRAI haben die umfangreichen Untersuchungen von WEISSBACH (1974) an Beagle-Rüden mit experimentell

erzeugtem unilateralem Kryptorchismus die These des japanischen Forschers bestätigt und quantitativ belegt.

In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, ein auf diesem Gebiet unerprobtes quantitatives Untersuchungsverfahren - das Punktzählverfahren - einzusetzen. SITTE (1967) modifizierte dieses Punktzählverfahren, auch "Treffermethode" genannt, das ursprünglich für die quantitative Analyse von Gesteinsanschliffen angewandt worden war (Glagoleff, 1933). Diese Untersuchungsmethode wurde in der Silikoseforschung (Weber u. a., 1973) erfolgreich angewandt.

Wir versprechen uns von dieser Treffermethode eine genauere quantitative Analyse der bei experimentell unilateralem Kryptorchismus bekannten Spermatogenesestörungen des orthotopen Hodens (Weißbach, 1974) ohne und unter der - in der Klinik häufig angewandten - HCG-Therapie. Die Wirkungsweise von HCG auf den Descensus eines retinierten Hodens kann und soll durch diese Experimente nicht geklärt werden.
Zur Beurteilung der Keimepithelschädigung wurden Parameter, wie Tubulusfläche, Anzahl und Fläche der Spermatogenesezellen, Kerndichte und relative Stadienfrequenz, herangezogen.

## B Überblick über den Ablauf, die Kinetik und die Stadieneinteilung der normalen Spermatogenese des Hundes

Die Spermatogenese erreicht beim Hund ihre volle Ausbildung nach dem neunten Lebensmonat (Hilscher, 1973). Zu diesem Zeitpunkt läßt das samenbildende Epithel drei verschiedene Zellgruppen erkennen:

1. Direkt auf der Basalmembran liegen die Spermatogonien, die drei verschiedene Zelltypen erkennen lassen: die A-, IM- (Intermediär-) und B-Spermatogonien. Während die A-Spermatogonien durch mitotische Teilungen in mehreren Generationen ($A_1$ - $A_4$) (Foote, u.a.,1972) vorliegen, bestehen die durch Mitose aus den $A_4$-Spermatogonien ( aus diesen gehen die Zellen der proliferierenden und regenerierenden Reihe hervor ) entstandenen IM- und die ebenfalls durch Mitose aus den IM- gebildeten B-Spermatogonien jeweils nur aus einer Generation.

2. Durch die letzte mitotische Teilung innerhalb der Entwicklungsreihe (Courot, u.a., 1970) entstehen die Spermatozyten, die Zellen der zweiten Gruppe, die in zwei Generationen vorhanden sind. Nach der oben erwähnten letzten Mitose befinden sich die Spermatozyten I (erste Generation) im präleptotänen Stadium, das den klassischen Stadien der Meiose-Prophase - Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese - vorausgeht. Im Anschluß an diese lange Prophase durchlaufen die Kerne relativ schnell die folgende Meta-, Ana- und Telophase und liegen nach der sich anschließenden ersten Reifeteilung als diploide Spermatozyten II (zweite Generation) vor. Eine DNA-Verdoppelung findet nicht mehr statt.

3. Durch die mitoseähnliche zweite Reifeteilung entsteht dann aus den Spermatozyten II die dritte Zellgruppe, die haploiden Spermatiden. Während eines langen und komplizierten Differenzierungsvorgangs er-

fahren diese eine erhebliche morphologische Veränderung. Nach ORTAVANT (1959) lassen sich während dieses Entwicklungsabschnittes Spermatiden mit rundem Kern und Spermatiden mit elongiertem Kern unterscheiden.

Als Ergebnis dieser Entwicklungsreihe liegen dann die fertigen Spermien vor, die in das Lumen abschwimmen.

Durch die oben beschriebenen Teilungen und Umformungen, die immer nach dem gleichen Schema und einem exakt eingehaltenen Zeitplan ablaufen, ergibt sich ein eigentümlicher Bewegungsablauf des samenbildenden Epithels:

Die $A_1$-Spermatogonien, die am Anfang der Entwicklungsfolge der Spermatogenese stehen, liegen in axialer Richtung um einen geringen Betrag entwicklungsverschoben hintereinander auf der Basalmembran. Durch die ständige und exakte Regeneration nach der Mitose von $A_4$- in Intermediär-Spermatogonien und $A_5$-Spermatogonien, aus denen durch Teilung wieder $A_1$-Spermatogonien entstehen (Regeneration des samenbildenden Epithels), rücken von der Basalmembran periodisch immer neue Zellen nach, wodurch die Zellen im Laufe der Entwicklung fast kontinuierlich zur Tubulusmitte verschoben werden, um nach Erreichen der Tubuluslichtung als ausgereifte Spermien abzuschwimmen.

Als Folge dieses spezifischen Bewegungsablaufes zeigt das Querschnittsbild eines Tubulus vier konzentrische Schichten, die Zellen aus mindestens vier aufeinanderfolgenden Entwicklungsreihen enthalten. Im Längsschnitt liegen die Zellen innerhalb der Schichten um einen geringen Betrag (entsprechend den $A_1$-Spermatogonien) entwicklungsverschoben hintereinander.

Die vier Schichten bestehen dem jeweiligen Entwicklungsstand entspre-

chend aus folgenden Zellen:

Die erste Schicht enthält jeweils Spermatogonien von der ersten bis zur letzten Generation. In der zweiten Schicht - die erste Spermatozytenschicht - liegen Spermatozyten I vom präleptotänen bis zum frühen pachytänen Stadium. Die dritte Schicht - die zweite Spermatozytenschicht - wird von Spermatozyten I vom späten pachytänen Stadium bis zur ersten Reifeteilung, Spermatozyten II und jungen runden Spermatiden gebildet. In der letzten Schicht befinden sich alte runde und alle elongierten Spermatiden bis zum ausgereiften Spermatozoon.

Nach HILSCHER (1964) bezeichnet man die Summe der Entwicklungsphasen, die die Keimzellen durchlaufen, um von einer in die nächste Schicht zu gelangen, als "Cyklus". FOOTE u. a. (1972) fanden heraus, daß diese Zyklen annähernd gleich lang sind und circa 13,6 Tage dauern.

Anhand von Ausschnittsbildern teilte IBACH (1974) die Spermatogenese des Hundes in 10 Stadien ein. Dabei wird der Ablauf der Spermatogenese durch 13 unterschiedliche Querschnittsbilder der Samenkanälchen dargestellt. Die vorliegende Arbeit folgt dieser Stadieneinteilung, unterteilt das Stadium Vb jedoch nicht in 1 und 2 (Tab. 1).

Lumen

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4. Schicht | SPE | SPE | SPE | SPE | SPE | SPE | SPE | SPE | SPE | SPE | SP | |
| 3. Schicht | P | P | P | D | 1.RT | II | 2.RT | SPR | SPR | SPR | P | P |
| 2. Schicht | R | L | Z | Z | Z | P | P | P | P | P | R | R |
| 1. Schicht | A | A | A | A | A | A | A | A | IM A | B A | A | A |
| Stadium | I | II | III | IV | Va | Vb | Vc | VI | VII | VIII | IX | X |

Tab. 1 : Schema der Spermatogenese des Hundes modifiziert nach IBACH (1974)

A, IM, B: Spermatogonien-Typen. R: präleptotäne Spermatozyten I, L: leptotäne Spermatozyten I, Z: zygotäne Spermatozyten I, P: pachytäne Spermatozyten I, D:diplotäne Spermatozyten I. 1.RT: erste Reifeteilung. II: Spermatozyten II. 2.RT: zweite Reifeteilung. SPR: runde Spermatiden, SRE: elongierte Spermatiden.
Im Stadium IX schwimmen die Spermatozoen (SP) ab, alle Zellgenerationen - mit Ausnahme der A-Spermatogonien - rücken eine Schicht höher.

## C Versuchsanordnung

### 1. Material

#### Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an 18 postpuberalen und - im Rahmen einer parallellaufenden Untersuchung - vorbiopsierten Beagle-Rüden durchgeführt.
Bei Versuchsbeginn waren die Hunde 2 Jahre alt und hatten ein durchschnittliches Gewicht von 17,5 Kilogramm. Die aus Inzucht-Stämmen hervorgegangenen Tiere wurden einzeln in nebeneinanderliegenden Einheitsboxen bei Fütterung mit Trockennahrung und Wasser nach Belieben gehalten.

#### I Versuchsserie 1

Die Versuchsserie 1 bestand aus 2 Gruppen mit jeweils 5 Tieren. Während die erste Gruppe - Kontrolltiere - normale Hunde enthielt, lag bei den Tieren der zweiten Gruppe - experimentelle Tiere - experimentell unilateraler Kryptorchismus vor.

#### II Versuchsserie 2

Die Versuchsserie 2 bestand ebenfalls aus einer Kontrollgruppe (4 normale Tiere) und einer experimentellen Gruppe (4 einseitig kryptorche Tiere).
Alle Tiere wurden mit dem humanen Choriongonadotropin PRIMOGONYL$^{R}$ (Schering AG) behandelt.

2. Versuchsablauf

a) Narkose

15 Minuten vor der Narkose erhielten die Tiere als Prämedikation COMBELEN$^{R}$ (Bayer Leverkusen), das in einer Dosierung von 0,25 - 0,5 mg pro kg Körpergewicht intramuskulär verabreicht wurde. Eine ausreichende Allgemeinanästhesie wurde durch intravenöse Injektion von NEMBUTAL$^{R}$ (Pentabarbital Natrium; Abbott S. A.; 2,5 mg pro kg Körpergewicht) erzielt. Die Narkosetiefe wurde durch Beobachtung des Reflexverhaltens kontrolliert.

b) Erzeugung des unilateralen Kryptorchismus

Bei den experimentellen Tieren beider Versuchsserien wurde der linke Hoden folgendermaßen in die Bauchhöhle verlagert:

Pararektalschnitt links, Spaltung der Externusaponeurose und Aufsuchen des Funiculus spermaticus. Dieser wurde von seiner Unterlage stumpf abgelöst und nach distal verfolgt. Der Hoden wurde stumpf aus dem Skrotalfach geschält und mit dem Funiculus spermaticus nach kranial gezogen, so daß der Samenstrang nach zentral verfolgt werden konnte. Unter Einschneiden des Musculus obliquus internus wurde der Samenstrang bis an das Peritoneum heran präpariert. Eröffnung des Peritoneums und Spaltung der Fascia spermatica externa mit Durchtrennung des Musculus cremaster zwischen zwei Overhold-Klemmen, wobei die Cremasterstümpfe umstochen wurden. Trennung der Vasa testicularia vom Ductus deferens, Verlagerung der Samenstranggebilde in die Bauchhöhle und Fixierung des Hodens an der lateralen Beckenwand mit Histoacryl-Kleber$^{R}$ (B. Braun AG, Melsungen). Fortlaufende Naht des Peritoneums und des Musculus obliquus internus. Naht des Musculus obliquus externus. Schichtweiser Wundverschluß.

Der so verlagerte Hoden wurde für drei Monate in der Bauhhöhle belassen.

c) Kastration

Nach Abschluß der Versuchsperiode erfolgte die Kastration aller Versuchstiere in NEMBUTAL$^{R}$-Allgemeinanästhesie. Dabei wurde auf die Hodengröße und die Durchblutungsverhältnisse geachtet, die durch die vorangegangenen Eingriffe (Biopsie, operative Verlagerung des linken Hodens) möglicherweise eine Beeinträchtigung erfahren haben könnten. Nach Incision des Skrotums wurde der Hoden mit seinen Hüllen stumpf aus dem Skrotalfach herausgelöst und die Tunica vaginalis testis gespalten. Hoden und Nebenhoden wurden nach Unterbindung der Vasa testicularia und des Ductus deferens abgesetzt.
Im Rahmen einer parallellaufenden Untersuchung wurde gleichzeitig auch die dystope Keimdrüse der Versuchstiere entnommen.

d) HCG-Behandlung

Während der 3-monatigen Behandlung wurde allen Hunden der Versuchsserie 2 HCG (Human Chorionic Gonadotropine; PRIMOGONYL$^{R}$, Schering AG) (2x/Woche, 5000 IE) intramuskulär injiziert.
Dieses artspezifische Hormon entspricht in seiner Wirkung vorwiegend dem gonadotropen Hormon ICSH (interstitial cell stimulating hormon) (Tonutti, 1953; Knorr, 1966).

## 3. Histologische Technik

Nach der Kastration wurden von dem entnommenen orthotopen Hoden vorsichtig der Nebenhoden und die Hüllen abpräpariert, die Tunica albuginea blieb dabei unverletzt. Der Hoden wurde dann längsgeteilt und sofort in Bouin'scher Lösung (15 T Pikrinsäure, 5 T Formalin, 1 T Eisessig) eine Stunde lang anfixiert.
Die beiden Hodenstücke wurden anschließend in Querrichtung in circa 5 Millimeter dicke Scheiben geschnitten, die dann weitere 2 Stunden in Bouin'scher Lösung durchfixiert wurden.

In der aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 99 %, je 2 Stunden lang) wurden die Präparate dehydriert und danach zweimal 12 Stunden lang in Benzoesäuremethylester und anschließend eine halbe Stunde lang in Benzol gegeben. Die Einbettung erfolgte in typischer Weise in PARAPLAST$^{R}$ (Sherwood Medical Industries Inc., St. Louis). Von den so behandelten Präparaten wurden 5 mü dicke Schnitte angefertigt, die mittels Eiweiß-Glycerin-Lösung auf Objektträger aufgezogen und bei 42$^{o}$C 48 Stunden lang getrocknet wurden.
Nach zweimaliger Behandlung mit Xylol waren die Schnitte entparaffiniert und wurden, nachdem sie durch die absteigende Alkoholreihe (99 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %) gebracht worden waren, eine Stunde lang fließend gewässert. Sie wurden dann nach der Perjodsäure-Schiff-Hämatoxylin-Technik gefärbt. Diese Färbung ist für eine genaue histologische Einordnung der Tubulusquerschnitte besonders geeignet (Hilscher, 1964). Anschliessend an den Färbevorgang wurden die Präparate nach dem üblichen Verfahren eingedeckt.

## D Ermittlung und statistische Bearbeitung der Ergebnisse

### 1. Auswertungsmethoden

#### a) Meßkriterien

In einer Probeauswertung wurde festgestellt, daß eine Stichprobe von 250 Tubuli (Versuchsserie 1) bzw. 200 Tubuli (Versuchsserie 2), d.h. 50 Kanälchenquerschnitte pro Organ für alle Untersuchungen repräsentativ ist.

Zur Messung wurde das jeweilige Präparat unter einem Mikroskop der Fa. LEITZ (SM-Lux) zeilenförmig nach runden Tubulusquerschnitten abgesucht, an denen dann die nachfolgenden Auswertungen vorgenommen wurden. Die Forderung nach Vermessung möglichst runder Kanälchenquerschnitte ergibt sich aus der Tatsache, daß bei länglichen, d.h. schräg angeschnittenen Tubuli eine größere Querschnittsfläche vorgetäuscht wird. Bei runden Querschnitten wurde vorausgesetzt, daß es sich um orthograd getroffene Hodentubuli handelte.

#### b) Ermittlung der relativen Stadienfrequenz

Die 50 quergeschnittenen Tubuli pro orthotopen Hoden (25 pro Objektträger) wurden bei 250facher Vergrößerung betrachtet.
Die Beurteilung der Stadienzugehörigkeit jedes Kanälchenquerschnittes erfolgte nach zwei Kriterien:

Zuerst wurden die Zellen innerhalb eines Tubulusquerschnittes nach kernmorphologischen Gesichtspunkten (Roosen-Runge, 1950) identifiziert, anschließend wurde die Zellformation, d.h. die Verteilung der verschiedenen Zellgenerationen auf die vier Schichten innerhalb des Tubulusquer-

schnittes mit der Stadieneinteilung (Tab. 1) verglichen.

Die Häufigkeit der so festgelegten Stadien wurde nach Tieren getrennt protokolliert.

Bezieht man die Häufigkeit der einzelnen Stadien auf die Anzahl der pro Organ ausgezählten Tubuli, so ergibt sich die relative Stadienfrequenz (Foote u.a., 1972). Nimmt man bei 50 ausgezählten Tubuli die Häufigkeit eines Stadiums z.B. mit 5 an, so ergibt sich eine relative Stadienfrequenz von 10 %.

Da nach FOOTE u.a. (1972) die relative Stadienfrequenz ein Maß für die Dauer eines Stadiums ist (je länger ein Stadium dauert, um so häufiger wird es im histologischen Bild angetroffen), kann über diese die Stadiendauer ermittelt werden. Dies gilt jedoch nur mit der Einschränkung, daß die Gesamtzyklusdauer bekannt ist. In der vorliegenden Arbeit konnte daher nur die Dauer der einzelnen Stadien bei den unbehandelten Tieren (Kontrolltiere der ersten Versuchsserie) ermittelt werden, da hier die Zyklusdauer mit 13,6 Tagen (Foote u.a., 1972) angegeben wird. Für das oben angeführte Beispiel ergibt sich demnach bei einer relativen Stadienfrequenz von 10 % eine Stadiendauer von (100:13,6 = 10:x) 1,36 Tagen.

Für die statistische Auswertung der Stadienfrequenz wurde für alle Kontrolltiere - für jedes Stadium getrennt - der Gesamtmittelwert errechnet, der dann mit dem Gesamtmittelwert der einzelnen Stadien der entsprechenden experimentellen Gruppe verglichen und graphisch dokumentiert wurde.

Für die Kontrollgruppe der ersten Versuchsserie wurde die Dauer der einzelnen Stadien in Tagen berechnet.

c) Zählung der Kerne aller Spermatogenesezellen pro Tubulus unter Berücksichtigung der Stadieneinteilung

Nach Festlegung des Stadiums wurden bei 250facher Vergrößerung die Kerne aller Spermatogenesezellen innerhalb der 50 Kanälchenquerschnitte pro Organ nach morphologischen Aspekten differenziert und ausgezählt. Entsprechend dem jeweiligen Stadium lassen sich dabei innerhalb einer gesamten Entwicklungsreihe folgende Zellgenerationen unterscheiden:

A-Spermatogonien
IM-Spermatogonien
B-Spermatogonien
präleptotäne Primärspermatozyten
leptotäne "
zygotäne "
diplotäne "
1. Reifeteilung
Sekundärspermatozyten
2. Reifeteilung
runde Spermatiden
elongierte Spermatiden

Die A-Spermatogonien konnten zwar innerhalb der Spermatogonienschicht als spezielle Zellgruppe sehr genau differenziert werden, eine Unterscheidung der einzelnen Generationen ($A_1$ - $A_4$) war jedoch aufgrund ihrer fast gleichen Kernfiguren lichtmikroskopisch nicht möglich. Deshalb wurden alle A-Spermatogonien zu einer Zellgruppe zusammengefaßt.

Die Protokollierung erfolgte getrennt nach Zellgruppen, Stadien und Tieren.

Da die Anzahl der Zellkerne pro Tubulusquerschnitt von der Größe der

Tubulusfläche abhängig ist, war ein quantitativer Zellvergleich erst nach einer Standardisierung sinnvoll. Hierzu wurde für jedes Stadium und für jede Kernfigur getrennt die Kernzahl pro Flächeneinheit (Kerndichte) festgelegt. Dabei wurde die Kernzahl auf eine Tubulusfläche von $10^5/\mu m^2$ = 0,1 $mm^2$ bezogen.

Aus den so ermittelten Werten wurden für die einzelnen Stadien - getrennt nach Tiergruppen - die Mittelwerte errechnet und graphisch dokumentiert.

Um die Entwicklung von der A-Spermatogonie bis zum fertigen Spermatozoon verfolgen und die Anzahl aller Kernfiguren dokumentieren zu können, mußten vier Zyklen mit jeweils zehn Stadien berücksichtigt werden.

Bei der Auswertung wurden besonders die pachytänen Primärspermatozyten berücksichtigt, da sie einmal besonders sicher von anderen Zellen zu unterscheiden sind und zum anderen fast während der gesamten Zyklusdauer vorhanden sind. Deshalb wurde der Vergleich der durchschnittlichen Kerndichte pro Stadium zwischen Kontrollgruppe und experimenteller Gruppe nur bei dieser Kernfigur durchgeführt.

d) Histometrische Bestimmungen mit Hilfe der Treffermethode

I Prinzip der Treffermethode

Für die nachfolgenden histometrischen Untersuchungen wurde das von SITTE (1967) für die Zytometrie modifizierte Punktzählverfahren angewandt. Dieses Punktzählverfahren, auch "Treffermethode" genannt, war ursprünglich zur quantitativen Analyse von Gesteinsanschliffen angegeben (Glagoleff, 1933) und später von CHALKLEY (1943) zur Bestimmung von Massenverhältnissen bestimmter histologischer Strukturen verwendet worden. HAUG (1955, 1962), der sich vor allem mit den optischen Grund-

lagen dieses Verfahrens befaßte, wandelte die Methode von CHALKLEY ab und schlug erstmalig die Verwendung eines regelmäßigen Gitternetzes vor. Nach HENNIG (1957, 1958), der die mathematischen Grundlagen der Treffermethode beschrieben hat, handelt es sich hierbei um die näherungsweise Integration einer Fläche mit Hilfe eines Quadratnetzes (Abb. 1). Die Kreuzungspunkte der Gitterlinien, die regelmäßig in der Ebene verteilt sind und ein Netz bzw. Gitter bilden, haben einen Abstand von $a_o$ und schließen eine Fläche von $a_o^2$ ein. Diese Fläche wird auch als Netzwert $A_o$ bezeichnet. Bei der Auswertung einer Fläche mit Hilfe eines solchen Quadratnetzes treten Grenzfälle auf, bei denen nur ein Teil der zu bestimmenden Fläche innerhalb des Netzes $a_o^2$ liegt. Diese Fälle werden nach der Lage der Mittelpunkte der betreffenden Netzquadrate beurteilt. Da die Mittelpunkte wiederum ein Punktnetz mit dem - gleichen - Netzwert $A_o$ bilden, ist es gleichgültig, ob die Mittelpunkte oder aber die Eckpunkte (Gitterpunkte) der betreffenden Quadrate ausgezählt werden. Beschränkt man sich daher auf die Zählung der Gitterpunkte, so wird ein Gitterpunkt dann als Treffer bezeichnet, wenn er innerhalb der äußeren Begrenzungslinie der auszuwertenden Fläche liegt. Ein Gitterpunkt, der auf die Grenzlinie der zu bestimmenden Fläche projiziert wird, ist als halber Treffer anzugeben (Sitte, 1967).
Da sich nach GLAGOLEFF (1933) und SITTE (1967) die Anzahl der Treffer $P_1$, $P_2$, ..., $P_n$ wie die Flächen $A_1$, $A_2$, ..., $A_n$ verhält, geben die ausgezählten Treffer Flächenanteile an (Weber, 1973). Die Größe einer Fläche läßt sich daher bei Anwendung der Treffermethode durch Auszählen der Treffer bestimmen.

Das für die nachfolgenden quantitativen Untersuchungen benutzte Gitter (Abb. 1) lag als Netzokular vor. Seine Größe wurde so gewählt, daß es bei einer Objektivvergrößerung von 40 (Gesamtvergrößerung 250mal) jeweils einen ganzen Tubulusquerschnitt überdeckte.
Um aus der Trefferzahl die absolute Tubulusfläche errechnen zu können,

mußte die Größe des Gitterwertes bzw. Netzwertes $A_o$ bestimmt werden. Die dazu erforderliche Eichung erfolgte unter Verwendung eines Objektmikrometers und ergab für $a_o$ (Abstand zweier Gitterpunkte) den Wert von 17 /um, was einem Netzwert $A_o$ (= $a_o^2$) von 289 /$um^2$ entspricht. Mit Hilfe des so bestimmten Netzwertes war es möglich, aus der Trefferzahl die absolute Tubulusfläche zu bestimmen, indem nämlich die Anzahl der über den Umriß einer Tubulusfläche bestimmten Treffer mit dem Netzwert ($A_o$ = 289 /$um^2$) multipliziert wurde.

Die Zuverlässigkeit der Treffermethode wurde in einer Pilotstudie überprüft, indem die Flächen von 20 Tubuli mit dem oben beschriebenen Gitter einmal planimetrisch, d.h. durch Auszählen der Quadrate, und zum anderen nach dem Punktzählverfahren bestimmt wurden. In der ersten Messung wurden die Quadrate, die einen Tubulus überdeckten, gezählt, wobei teilweise ausgefüllte Quadrate auf 1/4, 1/2 bzw. 3/4 geschätzt wurden. In der zweiten Messung wurde nur die Anzahl der Gitterpunkte, die über einem Kanälchen lagen, bestimmt und mit dem Netzwert multipliziert.
Die Abweichung der Treffermethode gegenüber der planimetrischen Auswertung betrug dabei maximal 2,5 %.

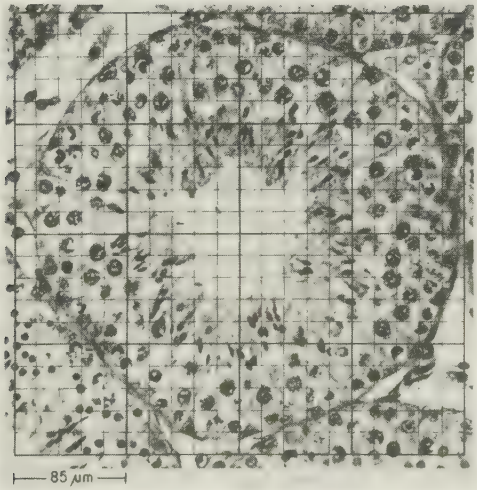



Abb. 1: Bestimmung der Tubulusfläche mit Hilfe eines in das Meßokular eingelegten Quadratnetzes
Vergrößerung ca. 600fach

II. Bestimmung der Tubulusfläche

Nach der oben beschriebenen Treffermethode wurde bei 50 quergeschnittenen - möglichst runden - Tubuli pro Organ die Trefferzahl bestimmt. Nach Multiplikation der Trefferzahl mit dem Netzwert wurden die Meßwerte nach Stadien und Tieren getrennt protokolliert.

In der statistischen Auswertung wurde zunächst für jedes Tier die durchschnittliche Tubulusfläche ermittelt. Dann wurde nach Bestimmung des Gesamtmittelwertes der Kontrolltiere die durchschnittliche Tubulusfläche der einzelnen experimentellen Tiere mit dem Gesamtmittelwert der entsprechenden Kontrollgruppe verglichen. Anschließend wurden die Gesamtmittelwerte beider Gruppen miteinander verglichen.

Wurden für die einzelnen Kontrolltiere und experimentellen Tiere die gemessenen Flächen von je 250 (Versuchsserie 1) bzw. 200 Tubuli (Versuchsserie 2) nach Stadien aufgeteilt, so ergaben sich für jedes Stadium zwei Werte, die miteinander statistisch verglichen und graphisch dokumentiert werden konnten.

III. Bestimmung der Kernfläche

Nach Ermittlung der Tubulusfläche wurde mit dem gleichen Gitter die Kernfläche der einzelnen Spermatogenesezellen pro Kanälchenquerschnitt bestimmt.
Hierzu wurde zunächst für die verschiedenen Kernfiguren pro Tubulus die Gesamttrefferzahl ermittelt. Aus dieser Gesamttrefferzahl (TR) und aus dem Netzwert ($A_o$) konnte dann die Gesamtfläche (KF) der verschiedenen Kernfiguren pro Tubulus errechnet werden. Durch Division dieser Gesamtfläche durch die Anzahl (n) der Zellen der jeweiligen Zellkategorie pro Kanälchenquerschnitt ergibt sich dann näherungsweise die durchschnittliche Kernfläche einer Zelle (kF):

$$kF = \frac{A_o \times TR}{n} \quad (/um^2)$$

Aus den so ermittelten Werten wurden für die einzelnen Kernfiguren - getrennt nach Stadien und Tiergruppen - die Mittelwerte errechnet und graphisch dokumentiert.
Für die Dokumentation war es wiederum erforderlich, die gesamte Entwicklungsreihe - 4 Zyklen mit jeweils 10 Stadien - zu berücksichtigen.
Wie im Absatz D 1c) über die Zählung der Kerne der Spermatogenesezellen dargelegt, mußten auch hier die verschiedenen Generationen der A-Spermatogonien zu einer Zellgruppe zusammengefaßt werden.
Ein Vergleich zwischen der Kernfläche der Kontrollgruppe und der experimentellen Gruppe erfolgte nur (s. Abs. D 1c) für die pachytänen Primärspermatozyten.

e) Statistische Methodik

Alle Meßdaten wurden zur weiteren Auswertung auf Lochkarten übertragen. Die erforderlichen Rechnungen wurden auf der Datenverarbeitungsanlage (SIEMENS DVA 305/6) des I K E N [+)] durchgeführt.

Für die einzelnen Tiere bzw. Tiergruppen wurden jeweils die Mittelwerte (arithmetisches Mittel), die dazugehörigen Varianzen, die Standardabweichung der Einzelwerte und die Standardabweichung der Mittelwerte berechnet.

[+)] An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Dipl.-Phys. K. Wesener (Institut für klinische und experimentelle Nuklearmedizin der Universität Bonn, Direktor: Prof. Dr. C. Winkler) für die Anfertigung der Statistikprogramme und die Hilfe bei der Durchführung der Berechnungen bedanken.

Für den Gruppenvergleich zwischen Kontrolltieren und experimentellen Tieren wurde der Student-Test (t-Test) benutzt. Mit dem t-Test wurde geprüft, ob die Differenz zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen statistisch signifikant oder irrelevant war. Die Voraussetzungen für die Anwendung des t-Tests sind:

1. Die Stichproben beider Gruppen verteilen sich gemäß einer Normalverteilung.
   Diese Voraussetzung wurde mit dem CHI-Quadrat-Test geprüft.

2. Die Varianzen beider Gruppen sind nicht statistisch signifikant voneinander verschieden.
   Diese Voraussetzung wurde mit dem F-Test geprüft.

Die Prüfgröße (PG) beim t-Test ist folgendermaßen definiert:

$$PG = \frac{X_1 - X_2}{S_D}$$

$$S_D^2 = \frac{(n_1 - 1)\, S_1^2 + (n_2 - 1)\, S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \frac{(n_1 + n_2)}{n_1 \cdot n_2}$$

$X_1$ , $X_2$ : Mittelwerte in beiden Gruppen
$n_1$ , $n_2$ : Stichprobenumfang in beiden Gruppen
$S_1^2$ , $S_2^2$ : Varianzen in beiden Gruppen

Die Prüfgröße PG wurde mit dem Schwellenwert der t-Verteilung bei der statistischen Sicherheit von 99 % verglichen. Je nach Fragestellung wurde die Prüfung einseitig oder zweiseitig durchgeführt.

Für den Fall, daß die Voraussetzungen für den t-Test nicht erfüllt waren,

wurde ersatzweise ein Signifikanztest nach GRAF, HENNING und STANGE (1966) benutzt.

Die entsprechenden Schwellenwerte für die statistische Sicherheit von 99 % wurden der Literatur entnommen (Sachs, 1969).

## 2. Ergebnisse und Statistik

### a) Relative Stadienfrequenz

#### Versuchsserie 1

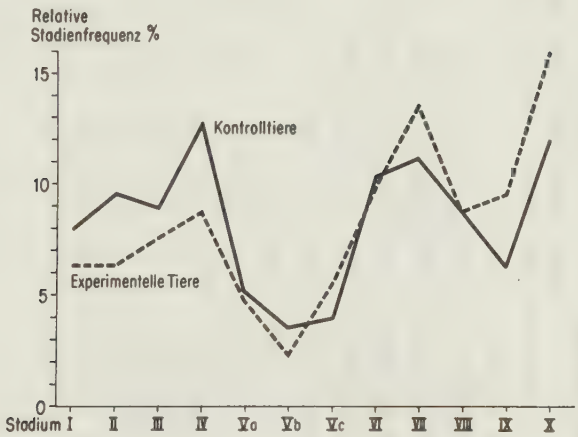
Für die Kontrolltiere liegt die relative Stadienfrequenz (Tab. 2) zwischen 3,6 % (Stadium Vb) und 12,8 % (Stadium IV), für die experimentellen Tiere zwischen 2,4 % (Stadium Vb) und 13,6 % (Stadium VII).
Zwischen Kontrollgruppe und experimenteller Gruppe liegt in keinem Stadium eine signifikante Verschiebung vor.
Die Werte der experimentellen Tiere sind in der ersten Hälfte des Zyklus (von Stadium I bis Stadium Vb in allen Stadien), die der Kontrolltiere in der zweiten Hälfte (von Stadium Vc bis Stadium X im Mittel) niedriger (Abb. 2a).

Für die Zyklusdauer der Kontrolltiere ergeben sich Werte zwischen 0,49 Tagen (Stadium Vb) und 1,74 Tagen (Stadium IV) (Tab. 2).

#### Versuchsserie 2

Bei den Kontrolltieren liegen die Werte zwischen 2,5 % (Stadium Vb) und 12,5 % (Stadium VII); bei den experimentellen Tieren liegen sie zwischen 0,5 % (Stadium Vb) und 12 % (Stadium IV) (Tab. 3).
Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und experimenteller Gruppe treten in keinem Stadium auf.
Die relative Stadienfrequenz der Kontrolltiere ist in den Stadien III, IV, VI und VII niedriger als bei den experimentellen Tieren (Abb. 2b)

2a Versuchsserie 1




2b Versuchsserie 2 (HCG-Gruppe)

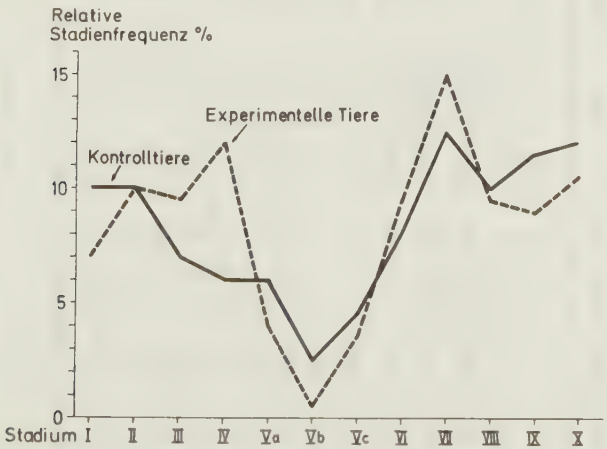



Abb. 2a und 2b : Relative Stadienfrequenz bei den Kontrolltieren und den experimentellen Tieren der Versuchsserien 1 und 2 in den 10 Stadien der Spermatogenese

| Stadium | Kontrolltiere: Häufigkeit 1854 | 1816 | 1876 | 1918 | 1920 | Relative Stadienfrequenz % | Dauer +) Tage | Experimentelle Tiere: Relative Stadienfrequenz % | Häufigkeit 1882 | 1896 | 1897 | 1901 | 1904 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 4 | 2 | 3 | 6 | 5 | 8 ± 3,2 | 1,09 | 6,4 ± 4,3 | 5 | 5 | - | 2 | 4 |
| II | 4 | 4 | 7 | 5 | 4 | 9,6 ± 2,6 | 1,31 | 6,4 ± 3,6 | 5 | 1 | 2 | 3 | 5 |
| III | 5 | 4 | 5 | 3 | 3 | 8 ± 2,0 | 1,09 | 7,6 ± 3,8 | 7 | 2 | 4 | 3 | 3 |
| IV | 9 | 7 | 5 | 4 | 7 | 12,8 ± 3,9 | 1,74 | 8,8 ± 3,3 | 7 | 3 | 4 | 3 | 5 |
| Va | 3 | 2 | 2 | 1 | 5 | 5,2 ± 3,0 | 0,71 | 4,8 ± 1,8 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| Vb | 3 | 1 | 3 | 2 | - | 3,6 ± 2,6 | 0,49 | 2,4 ± 2,6 | - | 1 | 2 | - | 3 |
| Vc | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 ± 0 | 0,54 | 5,6 ± 2,6 | 3 | 1 | 4 | 2 | 4 |
| VI | 5 | 4 | 5 | 7 | 5 | 10,4 ± 2,2 | 1,41 | 10 ± 2,8 | 5 | 5 | 5 | 7 | 3 |
| VII | 6 | 4 | 7 | 5 | 6 | 11,2 ± 2,3 | 1,52 | 13,6 ± 5,6 | 6 | 8 | 11 | 4 | 5 |
| VIII | 3 | 5 | 3 | 7 | 4 | 8,8 ± 4,1 | 1,20 | 8,8 ± 3,3 | 3 | 8 | 4 | 4 | 3 |
| IX | 2 | 8 | 2 | 1 | 3 | 6,4 ± 5,6 | 0,87 | 9,6 ± 5,2 | 4 | 2 | 3 | 8 | 7 |
| X | 4 | 7 | 6 | 7 | 6 | 12 ± 2,4 | 1,63 | 16 ± 7,1 | 4 | 12 | 8 | 11 | 5 |

+) Zyklusdauer nach FOOTE u.a. (1972) 13,6 Tage

Tab. 2: Stadienfrequenz der Versuchsserie 1 (ohne HCG-Behandlung)

| Stadium | Kontrolltiere: Häufigkeit 1627 | 1648 | 2120 | 2125 | Kontrolltiere: Relative Stadienfrequenz % | Experimentelle Tiere: Relative Stadienfrequenz % | Experimentelle Tiere: Häufigkeit 1628 | 1629 | 1637 | 1646 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 5 | 4 | 5 | 6 | 10 ± 1,6 | 7 ± 1,2 | 4 | 4 | 3 | 3 |
| II | 7 | 2 | 6 | 5 | 10 ± 4,3 | 10 ± 1,6 | 5 | 6 | 4 | 5 |
| III | 4 | 3 | 5 | 2 | 7 ± 2,6 | 9,5 ± 4,1 | 3 | 3 | 7 | 6 |
| IV | 3 | 3 | 3 | 3 | 6 ± 0 | 12 ± 4,6 | 4 | 4 | 8 | 8 |
| Va | 3 | 2 | 3 | 4 | 6 ± 1,6 | 4 ± 3,7 | 1 | 3 | 4 | - |
| Vb | - | 2 | 2 | 1 | 2,5 ± 1,9 | 0,5 ± 1 | - | 1 | - | - |
| VI | 3 | 6 | 3 | 4 | 8 ± 2,8 | 9,5 ± 1,9 | 4 | 5 | 4 | 6 |
| VII | 4 | 9 | 6 | 6 | 12,5 ± 4,1 | 15 ± 4,2 | 10 | 8 | 5 | 7 |
| VIII | 6 | 5 | 3 | 6 | 10 ± 2,8 | 9,5 ± 4,7 | 8 | 5 | 3 | 3 |
| IX | 6 | 7 | 6 | 4 | 11,5 ± 2,5 | 9 ± 4,8 | 1 | 6 | 5 | 6 |
| X | 7 | 5 | 6 | 6 | 12 ± 1,6 | 10,5 ± 1,9 | 6 | 4 | 6 | 5 |

Tab. 3: Stadienfrequenz der Versuchsserie 2 (mit HCG-Behandlung)

b) Anzahl der Kerne aller Spermatogenesezellen pro Tubulus

Versuchsserie 1

Die Kerndichte der experimentellen Tiere liegt fast während der gesamten Entwicklungsreihe über der der Kontrolltiere. Ausnahmen machen nur die A-Spermatogonien in den Stadien I, III, IX, die präleptotänen Primärspermatozyten im Stadium I, die zygotänen Primärspermatozyten im Stadium III und die Spermatiden mit rundem Kern im Stadium Vc (Abb. 3a).

Die Kerndichte der pachytänen Primärspermatozyten hat im Stadium Vb mit 79 Zellkernen/0,1 $mm^2$ den niedrigsten und im Stadium II mit 102 Zellkernen/0,1 $mm^2$ den höchsten Wert. Die Extremwerte für die experimentellen Tiere sind 90 Zellkerne/0,1 $mm^2$ (Stadium Vc) und 177 Zellkerne/0,1 $mm^2$ (Stadium II).
Die Unterschiede liegen zwischen +1 % (Stadium I) und +73,5 % (Stadium II) (Tab. 4).

Versuchsserie 2

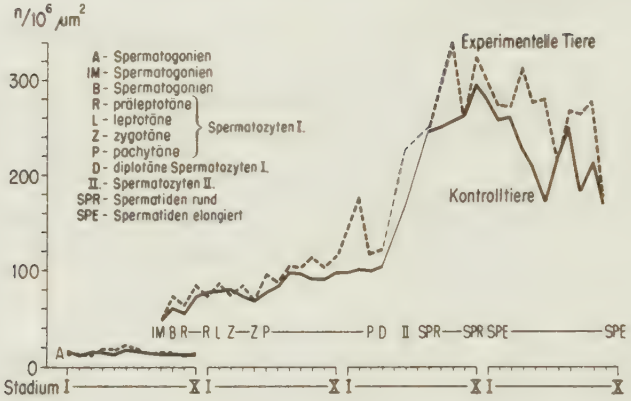
Außer bei den A-Spermatogonien im Stadium I, II, VI, bei den diplotänen Spermatozyten I im Stadium IV, bei den Sekundärspermatozyten, bei den Spermatiden mit rundem Kern im Stadium IX und bei den Spermatiden mit elongiertem Kern im Stadium IX ist die Kerndichte der experimentellen Tiere größer als die der Kontrolltiere (Abb. 3b).

Die Extremwerte der pachytänen Spermatozyten I der Kontrollgruppe sind 119 Zellkerne/0,1 $mm^2$ (Stadium VIII) und 160 Zellkerne/0,1 $mm^2$ (Stadium I). Die entsprechenden Werte für die experimentelle Gruppe sind 148 Zellkerne/0,1 $mm^2$ (Stadium VIII) und 183 Zellkerne/0,1 $mm^2$ (Sta-

dium III).

Die Unterschiede liegen zwischen +3,8 % (Stadium X) und +26,4 % (Stadium IX) (Tab. 4).

3a Versuchsserie 1




3b Versuchsserie 2 (HCG-Gruppe)

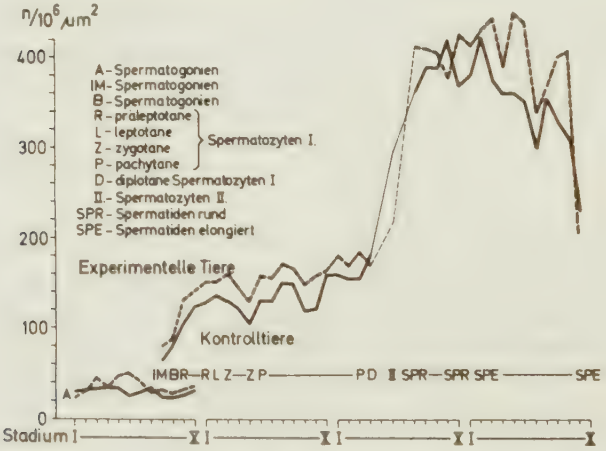



Abb. 3a und 3b : Kerndichte der Spermatogenesezellen innerhalb einer Entwicklungsreihe bei Kontrolltieren und experimentellen Tieren der Versuchsserien 1 und 2

| | Versuchsserie 1 | | | Versuchsserie 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Stadium | KT | ET | Differenz % | KT | ET | Differenz % |
| Vb | 79 | 98 | + 24,1 | 132 | 157 | + 19,7 |
| Vc | 85 | 90 | + 5,9 | 132 | 155 | + 17,4 |
| VI | 99 | 106 | + 7,1 | 154 | 174 | + 12,9 |
| VII | 98 | 104 | + 6,1 | 149 | 167 | + 12,1 |
| VIII | 93 | 115 | + 23,7 | 119 | 148 | + 24,4 |
| IX | 92 | 105 | + 14,1 | 125 | 158 | + 26,4 |
| X | 98 | 117 | + 19,4 | 158 | 164 | + 3,8 |
| I | 99 | 100 | + 1,0 | 160 | 181 | + 13,1 |
| II | 102 | 177 | + 73,5 | 156 | 168 | + 7,7 |
| III | 101 | 119 | + 17,8 | 156 | 183 | + 17,3 |

Tab. 4: Durchschnittliche Anzahl pachytäner Primärspermatozyten pro Flächeneinheit (Zellzahl/0,1 $mm^2$) - Kerndichte bei Kontrolltieren und experimentellen Tieren der Versuchsserien 1 und 2

c) Ergebnisse der Untersuchungen mit Hilfe der Treffermethode

I. Tubulusfläche

Versuchsserie 1 (Abb. 4a)

Die durchschnittliche Tubulusfläche - zusammengefaßt für alle Stadien - der einzelnen Kontrolltiere liegt zwischen 30431 /um$^2$ (KT 1854) und 34152 /um$^2$ (KT 1920), die der experimentellen Tiere zwischen 22478 /um$^2$ (ET 1904) und 33010 /um$^2$ (ET 1882).
Der Gesamtmittelwert der Kontrollgruppe (32261 /um$^2$) liegt mit 18,14 % signifikant höher als der der experimentellen Gruppe (26408 /um$^2$) (Tab. 5).

Die experimentellen Tiere 1896, 1897, 1901 und 1904 zeigen gegenüber dem Gesamtmittelwert der Kontrolltiere eine statistisch gesicherte signifikante Abnahme der Tubulusfläche (Tab. 6).

Nach Aufteilung der Tubulusflächen auf die 10 Stadien eines Zyklus ergeben sich für die Kontrolltiere Durchschnittswerte zwischen 29340 /um$^2$ (Stadium III) und 35006 /um$^2$ (Stadium VIII). Die entsprechenden Werte für die experimentellen Tiere liegen zwischen 22517 /um$^2$ (Stadium Vb) und 29684 /um$^2$ (Stadium III).
In den Stadien II, IV, Vb, Vc, VI, VII, VIII, IX und X liegt eine signifikant kleinere Tubulusfläche der experimentellen Tiere vor; der Unterschied liegt zwischen 11,53 % (Stadium II) und 33,05 % (Stadium Vb). Im Stadium III ist die Tubulusfläche der Kontrolltiere mit 1,17 % (nicht signifikant) kleiner als bei den experimentellen Tieren (Tab. 7).

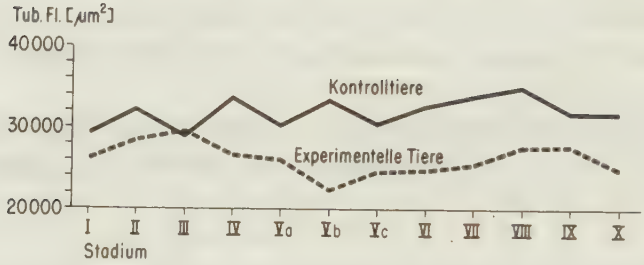
Versuchsserie 2 (Abb. 4b)

Bei der HCG-Gruppe liegt die durschnittliche Tubulusfläche der einzelnen Kontrolltiere zwischen 23735 /um$^2$ (KT 2120) und 30050 /um$^2$ (KT 1648), für die einzelnen experimentellen Tiere zwischen 23663 /um$^2$ (ET 1629) und 27481 /um$^2$ (ET 1628).
Die durchschnittliche Tubulusfläche der experimentellen Gruppe (26201 /um$^2$) liegt mit 3,41 % nicht signifikant unter der der Kontrollgruppe (27127 /um$^2$) (Tab. 8).

Gegenüber dem Gesamtmittelwert der Kontrolltiere zeigt das experimentelle Tier 1629 eine signifikante Abnahme der Tubulusfläche von 12,8 % (Tab. 9).

Bei Berücksichtigung der 10 Stadien liegt die durchschnittliche Tubulusfläche der Kontrolltiere zwischen 25206 /um$^2$ (Stadium VI) und 29016 /um$^2$ (Stadium VIII). Bei den experimentellen Tieren ergeben sich Extremwerte von 23571 /um$^2$ (Stadium Va) und 30170 /um$^2$ (Stadium VIII).
Eine signifikant kleinere Fläche liegt bei den experimentellen Tieren im Stadium Va (18,2 %) und VII (15,1 %) vor. In den Stadien II, VI, VIII und X ist die Tubulusfläche der Kontrolltiere im Mittel 3,2 % (nicht signifikant) kleiner als bei den experimentellen Tieren (Tab. 10).

4a Versuchsserie 1




4b Versuchsserie 2 (HCG-Gruppe)

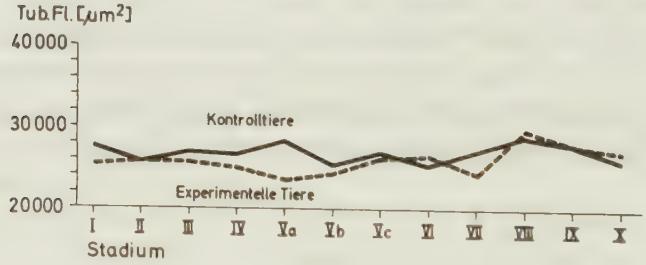



Abb. 4a und 4b : Durchschnittliche Tubulusflächen bei Kontrolltieren und experimentellen Tieren - aufgeteilt auf die 10 Stadien der Spermatogenese - der Versuchsserien 1 und 2

| Kontrolltiere | | Experimentelle Tiere | |
|---|---|---|---|
| Tier-Nr. | Tubulusfläche $/um^2$ | Tubulusfläche $/um^2$ | Tier-Nr. |
| 1854 | 30431 | 33010 | 1882 |
| 1860 | 32673 | 24464 | 1896 |
| 1876 | 31880 | 26158 | 1897 |
| 1918 | 32171 | 25932 | 1901 |
| 1920 | 34152 | 22478 | 1904 |
| Mittelwert | 32261 | 26408 | |
| Differenz | 18,14 % | | |

Tab. 5: Durchschnittliche Tubulusfläche bei Kontrolltieren und experimentellen Tieren - ohne Berücksichtigung der verschiedenen Stadien der Spermatogenese - der Versuchsserie 1 (ohne HCG-Behandlung)

| Durchschnittliche Tubulusfläche aller Kontrolltiere ($/um^2$) | Durchschnittliche Tubulusfläche der einzelnen experimentellen Tiere ($/um^2$) Tier-Nr. | | | Differenz % | Signifikanz P=0,01 |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1882 | 33010 | ± 0,13 % | + 2,32 | |
| | 1896 | 24464 | ± 0,17 % | -24,17 | x |
| 32261 ± 0,06 % | 1897 | 26158 | ± 0,14 % | -18,92 | x |
| | 1901 | 25932 | ± 0,15 % | -19,62 | x |
| | 1904 | 22478 | ± 0,17 % | -30,32 | x |

Tab. 6: Durchschnittliche Tubulusfläche der einzelnen experimentellen Tiere im Vergleich zum Gesamtmittelwert der Kontrolltiere bei der Versuchsserie 1 (ohne HCG-Behandlung)

| Stadium | Tubulusfläche KT ($\mu m^2$) | | Tubulusfläche ET ($\mu m^2$) | | Differenz % | Signifikanz P=0,01 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 29415 | ± 0,12 % | 26275 | ± 0,04 % | -10,67 | |
| II | 32329 | ± 0,05 % | 28600 | ± 0,22 % | -11,53 | x |
| III | 29340 | ± 0,12 % | 29684 | ± 0,17 % | + 1,17 | |
| IV | 33850 | ± 0,05 % | 26850 | ± 0,17 % | -20,68 | x |
| Va | 30377 | ± 0,20 % | 26150 | ± 0,21 % | -13,92 | |
| Vb | 33633 | ± 0,18 % | 22517 | ± 0,15 % | -33,05 | x |
| Vc | 30700 | ± 0,12 % | 24700 | ± 0,21 % | -19,54 | x |
| VI | 32689 | ± 0,08 % | 24944 | ± 0,08 % | -23,69 | x |
| VII | 33950 | ± 0,03 % | 25706 | ± 0,13 % | -24,28 | x |
| VIII | 35005 | ± 0,09 % | 27700 | ± 0,10 % | -20,87 | x |
| IX | 31944 | ± 0,14 % | 27792 | ± 0,11 % | -13,0 | x |
| X | 31800 | ± 0,09 % | 25050 | ± 0,20 % | -21,23 | x |

Tab. 7: Durchschnittliche Tubulusflächen für alle Kontrolltiere und experimentellen Tiere der Versuchsserie 1 (ohne HCG-Behandlung) aufgeteilt nach den 10 Stadien der Spermatogenese

| Kontrolltiere | | Experimentelle Tiere | |
|---|---|---|---|
| Tier-Nr. | Tubulusfläche /$um^2$ | Tubulusfläche /$um^2$ | Tier-Nr. |
| 1627 | 27339 | 27481 | 1628 |
| 1648 | 30050 | 23663 | 1629 |
| 2120 | 23735 | 26796 | 1637 |
| 2125 | 27382 | 26863 | 1646 |
| Mittelwert | 27127 | 26201 | |
| Differenz | 3,41 % | | |

Tab. 8: Durchschnittliche Tubulusfläche bei Kontrolltieren und experimentellen Tieren - ohne Berücksichtigung der verschiedenen Stadien der Spermatogenese - der Versuchsserie 2 (mit HCG-Behandlung)

| Durchschnittliche Tubulusfläche aller Kontrolltiere ($/um^2$) | Durchschnittliche Tubulusfläche der einzelnen experimentellen Tiere ($/um^2$) Tier-Nr. | | | Differenz % | Signifikanz P=0,01 |
|---|---|---|---|---|---|
| 27127 ± 17,2 % | 1628 | 27481 | ± 16,4 % | + 1,3 | |
| | 1629 | 23663 | ± 17,9 % | -12,8 | x |
| | 1637 | 26796 | ± 15,5 % | - 1,2 | |
| | 1646 | 26863 | ± 19,8 % | - 1,0 | |

Tab. 9: Durchschnittliche Tubulusfläche der einzelnen experimentellen Tiere im Vergleich zum Gesamtmittelwert der Kontrolltiere bei der Versuchsserie 2 (mit HCG-Behandlung)

| Stadium | Tubulusfläche KT ($/um^2$) | | Tubulusfläche ET ($/um^2$) | | Differenz % | Signifikanz P=0,01 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 26826 | ± 15,4 % | 25649 | ± 18,3 % | - 4,4 | |
| II | 25800 | ± 15,4 % | 25887 | ± 20,1 % | + 0,3 | |
| III | 27145 | ± 11,8 % | 25888 | ± 19,2 % | - 4,6 | |
| IV | 26395 | ± 20,1 % | 25257 | ± 16,6 % | - 4,3 | |
| Va | 28816 | ± 19,2 % | 23571 | ± 11,8 % | -18,2 | x |
| Vb | 25288 | ± 22,6 % | 24276 | ± 15,4 % | - 4,0 | |
| Vc | 27022 | ± 12,0 % | 26258 | ± 15,6 % | - 2,8 | |
| VI | 25206 | ± 12,2 % | 26405 | ± 10,4 % | + 4,8 | |
| VII | 28524 | ± 20,0 % | 24228 | ± 15,6 % | -15,1 | x |
| VIII | 29016 | ± 21,0 % | 30170 | ± 25,7 % | + 4,0 | |
| IX | 27825 | ± 16,5 % | 27808 | ± 13,3 % | - 0,1 | |
| X | 25998 | ± 13,6 % | 26967 | ± 14,8 % | + 3,7 | |

Tab. 10: Durchschnittliche Tubulusflächen für alle Kontrolltiere und experimentellen Tiere der Versuchsserie 2 (mit HCG-Behandlung) aufgeteilt nach den 10 Stadien der Spermatogenese

## II. Kernfläche

### Versuchsserie 1

Die Kernfläche der experimentellen Tiere (ohne Berücksichtigung der A-Spermatogonien) ist in den meisten Stadien kleiner als die der Kontrolltiere. Lediglich die B-Spermatogonien, die leptotänen Spermatozyten I und die pachytänen Primärspermatozyten im Stadium III, Vb und Vc sind in der experimentellen Gruppe deutlich größer als in der Kontrollgruppe (Abb. 5a).

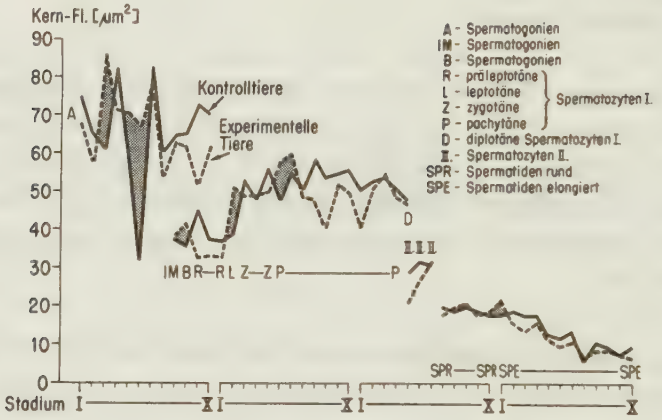
Die pachytänen Primärspermatozyten der Kontrolltiere nehmen im Stadium Vb mit 48,1 $/um^2$ die kleinste und im Stadium VII mit 59,4 $/um^2$ die größte Fläche ein. Die entsprechenden Extremwerte der experimentellen Tiere sind 40,9 $/um^2$ (Stadium VIII) und 60,2 $/um^2$ (Stadium Vc). Zwischen Kontrollgruppe und experimenteller Gruppe liegen Größenunterschiede von + 20,6 % (Stadium Vb) bis - 24 % (Stadium VIII) vor (Tab. 11).

### Versuchsserie 2

Deutliche Größenunterschiede zwischen Kontrollgruppe und experimenteller Gruppe ergeben sich nur in den Stadien III, IV, Va und Vb (Abb. 5b).

Die Größe der pachytänen Spermatozyten I der Kontrolltiere liegt zwischen 40,7 $/um^2$ (Stadium Vb) und 46,8 $/um^2$ (Stadium IX), die der experimentellen Tiere zwischen 34,2 $/um^2$ (Stadium Vb) und 47,3 $/um^2$ (Stadium Vc).
Die Größenunterschiede liegen zwischen + 28,7 % (Stadium III) und - 15,9 % (Stadium Vb) (Tab. 12).

5a Versuchsserie 1




5b Versuchsserie 2 (HCG-Gruppe)

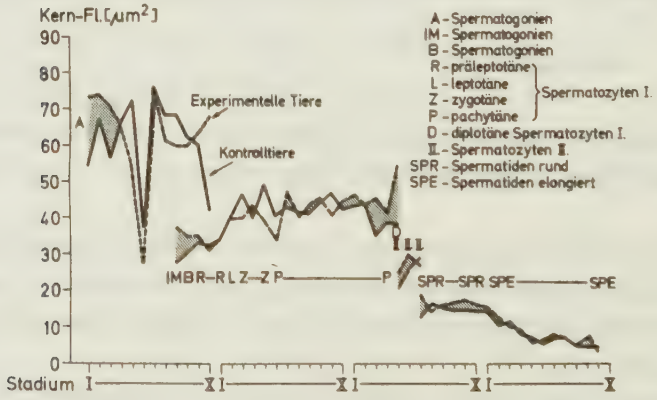



Abb. 5a und 5b : Kernfläche der Spermatogenesezellen innerhalb einer Entwicklungsreihe bei Kontrolltieren und experimentellen Tieren der Versuchsserien 1 und 2

| Stadium | Kontrolltiere KF /um² | n | kF /um² | Experimentelle Tiere KF /um² | n | kF /um² | Diff. % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vb | 1284,5 | 26,7 | 48,1 | 1276,5 | 22 | 58 | +20,6 |
| Vc | 1430,8 | 26,2 | 54,6 | 1341,6 | 22,3 | 60,2 | -10,3 |
| VI | 1656,2 | 32,2 | 51,4 | 1283,4 | 26,4 | 48,7 | - 5,3 |
| VII | 1976,5 | 33,3 | 59,4 | 1271 | 26,7 | 47,6 | -19,9 |
| VIII | 1753,8 | 32,6 | 53,8 | 1307 | 31,9 | 40,9 | -24 |
| IX | 1635,1 | 29,5 | 55,4 | 1499,4 | 29,1 | 51,6 | - 6,9 |
| X | 1748,5 | 31,3 | 55,9 | 1445,1 | 29,2 | 49,5 | -11,5 |
| I | 1481,5 | 29 | 51,1 | 1086,6 | 26,3 | 41,3 | -19,2 |
| II | 1740 | 33 | 52,8 | 1707,1 | 33,3 | 51,2 | - 3 |
| III | 1589,5 | 29,6 | 53,7 | 1924,3 | 35,3 | 54,5 | + 1,5 |

KF: Durchschnittliche Gesamtfläche pro Tubulus

n : Durchschnittliche Anzahl pro Tubulus

kF: Durchschnittliche Fläche

Diff: Differenz der Kernflächen (kF) bezogen auf die Kontrollgruppe

Tab. 11: Durchschnittliche Kernfläche der pachytänen Primärspermatozyten bei Kontrolltieren und experimentellen Tieren der Versuchsserie 1

| Stadium | Kontrolltiere KF /um² | n | kF /um² | Experimentelle Tiere KF /um² | n | kF /um² | Diff. % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vb | 1358,3 | 33,4 | 40,7 | 1300,5 | 38 | 34,2 | -15,9 |
| Vc | 1541,2 | 35,8 | 43,1 | 1919,8 | 40,6 | 47,3 | + 9,8 |
| VI | 1607,7 | 38,8 | 41,5 | 1848,2 | 46,1 | 40,1 | - 3,3 |
| VII | 1751,3 | 42,6 | 41,1 | 1772,4 | 40,3 | 44 | + 6,9 |
| VIII | 1524,5 | 34,5 | 44,2 | 2007,7 | 44,5 | 45,1 | + 2 |
| IX | 1621 | 34,7 | 46,8 | 1814,3 | 43,8 | 41,4 | -11,5 |
| X | 1716,1 | 41 | 41,9 | 2002,5 | 44,3 | 45,2 | + 7,9 |
| I | 1856,8 | 43,3 | 42,9 | 1826,8 | 39,3 | 46,5 | + 8,4 |
| II | 1784,6 | 40,4 | 44,2 | 1936,3 | 43,5 | 44,5 | + 0,6 |
| III | 1496,7 | 42,3 | 35,4 | 2160 | 47,7 | 45,6 | +28,7 |

KF: Durchschnittliche Gesamtfläche pro Tubulus

n : Durchschnittliche Anzahl pro Tubulus

kF: Durchschnittliche Kernfläche

Diff.: Differenz der Kernflächen (kF) bezogen auf die Kontrollgruppe

Tab. 12: Durchschnittliche Kernfläche der pachytänen Primärspermatozyten bei Kontrolltieren und experimentellen Tieren der Versuchsserie 2

## E Diskussion

Die Morphologie des samenbildenden Epithels wird z. Z. weniger nach quantitativen Gesichtspunkten beurteilt als vielmehr durch subjektive Beschreibung des histologischen Bildes nach qualitativen Gesichtspunkten. Die einzig gebräuchlichen quantitativen Methoden zur Einschätzung der Fertilitätsstörung bei Fehllage einer männlichen Keimdrüse sind die vergleichende Messung der Durchmesser der Tubuli contortii und die Zählung der Spermatogonien (Städtler, 1971; Städtler u. a., 1972; Hecker, 1972; Städtler, 1973; Weißbach 1974 ; Mönks, 1975). Die vorliegende Arbeit versucht, mit Hilfe des Punktzählverfahrens zu genaueren quantitativen Ergebnissen zu gelangen. Dieses Untersuchungsverfahren, auch Treffermethode genannt, wurde ursprünglich in der Gesteinskunde angewandt (Glagoleff, 1933) und von SITTE (1967) für die Zytometrie modifiziert. Bei der Treffermethode, die von WEBER u. a. (1973) erfolgreich in der Silikoseforschung eingesetzt wurde, handelt es sich um die näherungsweise Integration einer Fläche mit Hilfe eines Quadratnetzes. Wir versprechen uns von der Anwendung dieser differenzierten quantitativ-histometrischen Untersuchungsmethode Hinweise zur Aufklärung des Mechanismus der Fertilitätsstörung, zum anderen wollen wir damit eine exaktere und nach Möglichkeit für den Routinebetrieb nicht aufwendigere Methode als die deskriptiv-quantitative erproben.

Bedingt durch den eigentümlichen Bewegungsablauf des samenbildenden Epithels (Abs. B) enthalten die einzelnen Tubulusquerschnitte entsprechend dem jeweiligen Entwicklungsstand wechselnde Zellpopulationen (Tab. 1). Aufgrund dieser unterschiedlichen lokalen Verhältnisse können also Tubulusquerschnitte verschiedener Individuen nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden. Für die vorliegende Untersuchung ergab sich daraus zwangsläufig die Notwendigkeit, als ersten Schritt die Stadienzugehörigkeit des zu untersuchenden Tubulus zu bestimmen und alle weiteren Auswertungen unter Berücksichtigung der verschiedenen

Spermatogenesestadien vorzunehmen. Es bot sich daher an, innerhalb unserer quantitativen Untersuchungen auch die relative Stadienfrequenz zu bestimmen und die Werte der einzelnen Tiergruppen miteinander zu vergleichen. Die "relative Stadienfrequenz", ein von FOOTE u. a. (1972) geprägter Begriff, gibt das Verhältnis der Häufigkeit der einzelnen Stadien zur Gesamtzahl der pro Hoden ausgezählten Tubuli an und läßt Rückschlüsse auf die Dauer der einzelnen Stadien zu. Wie oben dargelegt, handelt es sich bei der Stadienfrequenz um einen relativen Wert. Eine vergleichende quantitative Aussage wäre daher nur über die Zyklusdauer als Bezugsgröße möglich. Da jedoch nur die Zyklusdauer der normalen, unbehandelten Hunde - nach FOOTE u. a. (1972) 13,6 Tage - bekannt ist und die Ermittlung der Zyklusdauer bei den anderen Tiergruppen im Rahmen dieser Arbeit wegen der dafür notwendigen Doppelmarkierungen mit nachfolgender autoradiographischer Untersuchung nicht durchgeführt werden konnte, war eine quantitative Auswertung nur für die Normaltiere möglich (Tab. 2). Der Vergleich innerhalb der beiden Versuchsserien konnte nur nach qualitativen Gesichtspunkten erfolgen. Dieser Vergleich zeigt, daß bei der Versuchsserie 1 (Tiere ohne HCG-Behandlung) die Werte der experimentellen Tiere während der ersten Hälfte des Zyklus deutlich unter und während der zweiten Hälfte deutlich über denen der Kontrolltiere liegen (Abb. 2a). Bezogen auf die Zyklusdauer könnte dies bedeuten, daß die Spermatogenese im orthotopen Hoden von einseitig kryptorchen Tieren gegenüber normalen Tieren anfangs beschleunigt, in der zweiten Hälfte jedoch verzögert abliefe.

Der Vergleich innerhalb der Versuchsserie 2 (HCG-Gruppe) läßt keine klare Aussage zu, da die Werte in den einzelnen Stadien keine Gesetzmäßigkeiten erkennen lassen (Abb. 2b).

Wollte man die Stadiendauer als einen der Parameter für die Beurteilung der Hodenfunktion benutzen, so müßte für jeden Fall die Zyklusdauer mitbestimmt werden. Diese Bestimmung ist jedoch im Routinebetrieb bei Patienten unmöglich.

Da die Ermittlung der Kernfläche der einzelnen Spermatogenesezellen nur über eine differenzierte Zählung der an der Spermatogenese beteiligten Zellen möglich war und zusätzlich die Tubulusfläche bestimmt wurde, bot es sich an, vergleichende Betrachtungen über die Kerndichte bei den einzelnen Versuchsgruppen anzustellen. Ein Vergleich der absoluten Zellzahlen war nicht sinnvoll, da die Anzahl der Zellen von der Tubulusgröße abhängt.
Der Vergleich zwischen Kontrollgruppe und experimenteller Gruppe zeigt, daß bei beiden Versuchsserien die Kerndichte der experimentellen Tiere im Mittel größer ist als die der Kontrolltiere (Abb. 3a und 3b).
Die Dokumentation und Auswertung hat gezeigt, daß zur Beurteilung der Kerndichte unter den verschiedenen Versuchsbedingungen allein die Berücksichtigung der pachytänen Primärspermatozyten ausreicht, da alle Generationen des samenbildenden Epithels zueinander in Beziehung stehen und die pachytänen Primärspermatozyten außer im Stadium IV während der gesamten Zyklusdauer vorhanden sind. Hierdurch verringert sich nicht nur der Arbeitsaufwand, sondern auch die Genauigkeit der Ermittlung wird erhöht, da sich die pachytänen Primärspermatozyten aufgrund ihrer Größe und ihrer charakteristischen Kernfiguren eindeutig und leicht identifizieren lassen.
Vergleicht man die Kerndichte der pachytänen Primärspermatozyten, so zeigen in beiden Untersuchungsreihen die experimentellen Tiere deutlich höhere Werte (Tab. 4).
Dieses Ergebnis weist auf eine Beeinflussung des samenbildenden Epithels des orthotopen Hodens bei experimentell unilateralem Kryptorchismus hin. Die Erklärung hierfür wird später bei der Gegenüberstellung der verschiedenen Parameter gegeben.

Im Gegensatz zu den vergleichbaren Untersuchungen von STÄDTLER (1971), HECKER (1972), WEISSBACH (1974), MÖNKS (1975) und WIESE (1975), die den Tubulusdurchmesser bestimmt haben, wurde in der vorliegenden Arbeit die Bestimmung der Tubulusfläche unter Berücksichti-

gung der einzelnen Spermatogenesestadien vorgenommen.
Dabei zeigt der Vergleich zwischen Kontrollgruppe und experimenteller Gruppe der Versuchsserie 1 (Tiere ohne HCG-Behandlung), daß mit Ausnahme von Stadium I, III und Va in allen Stadien eine signifikante Abnahme der Tubulusfläche bei den experimentellen Tieren festzustellen ist (Abb. 4a und Tab. 7). In den Stadien I und Va liegen die Differenzen nur geringfügig unter der Signifikanzgrenze, so daß auch sie den Trend zur Abnahme der Tubulusfläche unter Versuchsbedingungen bestätigen. Lediglich im Stadium III ist die Tubulusfläche der experimentellen Gruppe geringfügig größer als die der Kontrolltiere. Da jedoch bei allen anderen Stadien eine deutliche und fast gleich große Differenz zu beobachten ist, erscheint es uns gerechtfertigt, bei Routineverfahren auf die Berücksichtigung der Stadieneinteilung zu verzichten.
Vergleicht man also den Gesamtmittelwert aller Kontrolltiere mit dem der experimentellen Tiere, so zeigt sich, daß die durchschnittliche Tubulusfläche der experimentellen Gruppe mit 18,14 % signifikant kleiner ist als die der Kontrollgruppe (Tab. 5). Auch dieser Parameter zeigt eine degenerative Beeinflussung des samenbildenden Epithels des orthotopen Hodens bei experimentell unilateralem Kryptorchismus.
Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse, die mit der Messung des Tubulusdurchmessers gewonnen wurden (Städtler, 1971; Hecker, 1972; Weißbach, 1974; Mönks, 1975; Wiese, 1975).
Der Vergleich der durchschnittlichen Tubulusfläche der einzelnen experimentellen Tiere mit dem Gesamtmittelwert der Kontrolltiere ergibt, daß bei vier Tieren die Tubulusfläche signifikant abgenommen hat. Nur das experimentelle Tier Nr. 1882 liegt mit 2,32 % geringfügig über dem Gesamtmittelwert der Kontrolltiere und weist eine deutlich größere Tubulusfläche (33010 $/um^2$) auf als die übrigen experimentellen Tiere (Tab. 6). Bei diesem Tier scheint also durch die Verlagerung eines Hodens die orthotope Keimdrüse nicht beeinträchtigt worden zu sein. Dieser Befund bestätigt die Beobachtung (Scott, 1961; Niermann, 1972), daß unilateraler Kryptorchismus nicht in allen Fällen zu Fertilitätsstörungen führt.

Die Ergebnisse der Tubulusmessungen bei der HCG-Gruppe (Versuchsserie 2) (Abb. 4b) zeigen überwiegend keine signifikanten Unterschiede zwischen experimenteller Gruppe und Kontrollgruppe. Lediglich im Stadium Va und VII (Tab. 10) und bei dem experimentellen Tier Nr. 1629 (Tab. 9) liegen die ermittelten Werte über der Signifikanzgrenze. Hieraus könnte man ableiten, daß die durch den Kryptorchismus verursachte und bei der Versuchsserie 1 nachgewiesene Alteration durch die HCG-Therapie verhindert wird. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Kontrolltiere der Versuchsserie 2 mit HCG behandelt wurden. Das bedeutet, daß zur Beurteilung der HCG-Therapie zunächst die Tubulusflächen der Kontrolltiere beider Versuchsserien miteinander verglichen werden müssen. Das Resultat dieses Vergleichs: Die durchschnittliche Tubulusfläche der HCG-behandelten Kontrolltiere ist mit 15,91 % signifikant kleiner als die der unbehandelten Tiere. Im Gegensatz dazu weisen die experimentellen Tiere beider Gruppen im Mittel fast gleich große Tubuli auf. Daraus folgt:

1. Die HCG-Therapie führt bei geschlechtsreifen Normaltieren zu einer Verkleinerung der Tubulusfläche.

2. Die HCG-Therapie hebt die Schädigung, die der orthotope Hoden unter den Bedingungen des experimentell unilateralen Kryptorchismus erfährt, nicht auf.

Auch bei der Bestimmung der Kernfläche hat sich die Treffermethode bewährt. Hierbei wurde nämlich unsere qualitative Erwartung - Abnahme der Kernfläche der Spermatogenesezellen während der Entwicklung von der A-Spermatogonie bis zum fertigen Spermatozoon - quantitativ bestätigt. Die Treffermethode scheint uns gerade für die Kernflächenmessung besonders geeignet zu sein, da in einem einmaligen Arbeitsgang die Fläche aller an der Spermatogenese beteiligten Zellkerne näherungsweise bestimmt werden kann.

Wie der Gruppenvergleich innerhalb der Versuchsserie 1 zeigt, liegt die Kernfläche der experimentellen Tiere meist unter der der Kontrolltiere. Lediglich die B-Spermatogonien, die leptotänen sowie die frühen pachytänen Primärspermatozyten sind in der experimentellen Gruppe deutlich größer als in der Kontrollgruppe. Dabei fällt besonders die Aufblähung der frühen pachytänen Primärspermatozyten auf, die von IBACH (1974) auch im mikroskopischen Bild beobachtet wurde und die offenbar im orthotopen Hoden der experimentellen Tiere besonders drastisch ausfällt und auf eine Schädigung hinweisen könnte (Abb. 5a).
In der Versuchsserie 2 (HCG-Gruppe) sind die Größenunterschiede zwischen Kontrollgruppe und experimenteller Gruppe nicht so deutlich. Die Aufblähung der frühen pachytänen Primärspermatozyten, die in der Versuchsserie 1 auffällt, ist nach der HCG-Behandlung nicht festzustellen. Deutlich ist hier jedoch die Größenzunahme der diplotänen Primärspermatozyten bei den experimentellen Tieren. Diese Vergrößerung bewirkt wahrscheinlich, daß die Zellkerne nach der 2. Reifeteilung im Durchschnitt etwas größer sind als in der Kontrollgruppe (Abb. 5b).
Vergleicht man die beiden Versuchsserien miteinander, so fällt auf, daß die Kernfläche innerhalb der Versuchsserie 1 für fast alle Kernfiguren größer ist als bei der Versuchsserie 2 (HCG-Gruppe). Dieses Ergebnis weist, ähnlich wie bei der Tubulusfläche, auf eine zusätzliche Beeinflussung des samenbildenden Epithels durch die HCG-Therapie hin.

Im folgenden Abschnitt soll nun versucht werden, die wichtigsten verwertbaren Aussagen, die sich aus der Untersuchung der ausgewählten Parameter ergeben haben, zu korrelieren. Dabei sollen nur die Ergebnisse der Versuchsserie 1 betrachtet werden, da sie nicht durch die HCG-Therapie beeinflußt worden sind.
Bei den experimentellen Tieren nehmen die durchschnittliche Tubulusfläche erheblich und die durchschnittliche Kernfläche nur geringfügig ab, während die Kerndichte deutlich ansteigt. Man könnte also annehmen, daß die Verkleinerung der Tubulusfläche nur durch die Abnahme der Kern-

fläche bedingt sei. Dies wäre dann der Fall, wenn die Anzahl der Spermatogenesezellen pro Tubulus gleich geblieben wäre. WEISSBACH (1974) beschreibt jedoch bei Hunden mit unbehandeltem experimentell unilateralem Kryptorchismus eine signifikante Abnahme der Spermatozytenzahl pro Tubulus. Diese Tatsache bedeutet, daß die Verkleinerung der Tubulusfläche auch zu einem Teil durch die Abnahme der an der Spermatogenese beteiligten Zellen hervorgerufen wird. Der Verlust von 18,14 % der Tubulusfläche wird hierdurch allerdings nicht ausreichend erklärt. Es muß vielmehr angenommen werden, daß die Verkleinerung der Tubulusfläche zu einem grossen Teil auch noch entweder durch die Abnahme des freien Lumens, des Zytoplasmas der Spermatogenesezellen, der Sertolizellen oder aller drei Komponenten hervorgerufen wird.

Die Untersuchung der drei Parameter: Kerndichte, Tubulusfläche, Kernfläche,unter den Bedingungen des experimentell unilateralen Kryptorchismus weist beim Hund auf eine degenerative Beeinflussung von Tubulus und samenbildendem Epithel hin. Ursache und Mechanismus konnten und sollten in dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Für das weitere Vorgehen bei Routineuntersuchungen schlagen wir aufgrund unserer bei dieser Arbeit gewonnenen Erfahrung folgendes vor:

1. Da die Tubulusfläche alle Möglichkeiten einer Schädigung integriert, erscheint es uns ratsam, neben der Bestimmung der Kernfläche und Kerndichte der pachytänen Primärspermatozyten besonders die Tubulusfläche zu beachten.

2. Um zu noch differenzierteren Aussagen zu gelangen, wird weiterhin empfohlen, auch die Größe des freien Lumens zu bestimmen, da hierdurch nach Abzug der Lumenfläche von der Tubulusfläche die Auswirkung des unilateralen Kryptorchismus auf die zellulären Tubulusbestandteile beurteilt werden kann.

## F Zusammenfassung

Die Ergebnisse, die mit Hilfe des Punktzählverfahrens in der Silikoseforschung erzielt worden waren, erlauben es, diese Untersuchungsmethode auch zur Beurteilung der Hodenfunktion heranzuziehen. Bei diesem Verfahren, auch Treffermethode genannt, handelt es sich um die näherungsweise Integration einer Fläche mit Hilfe eines Quadratnetzes.
Mit der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die herkömmlichen quantitativen Verfahren zur Beurteilung der Hodenmorphologie durch die Anwendung der Treffermethode zu erweitern. Dies wurde unter den Bedingungen des experimentell unilateralen Kryptorchismus am orthotopen Hoden von 10 unbehandelten und 8 mit HCG-behandelten, postpuberalen Beagle-Rüden durchgeführt. Als geeignete morphometrische Parameter stellten sich die Kernzahl pro Tubulusfläche (Kerndichte) und die Kernfläche der pachytänen Primärspermatozyten sowie die Tubulusfläche heraus.
Die Ergebnisse aus den Untersuchungen dieser Parameter weisen bei den unbehandelten Tieren auf eine negative Beeinflussung des orthotopen Hodens durch die dystope Keimdrüse unter den Bedingungen des experimentell unilateralen Kryptorchismus hin und bestätigen damit ähnliche Befunde anderer Autoren.
Bei den HCG-behandelten Hunden wird die Bewertung dadurch erschwert, daß durch die HCG-Applikation eine Alteration des samenbildenden Epithels der Kontrolltiere hervorgerufen wird. Dadurch ergeben sich keine signifikanten Differenzen zwischen den Kontrolltieren und den experimentellen Tieren.
Dieser Befund sollte zu einer Überprüfung der in der Klinik bei Maldescensus testis häufig angewandten Hormontherapie Anlaß geben.

## G Literaturverzeichnis


Bay, V.
P. Mattheas
C. Schirren
Morphologische Befunde bei Hodenhochstand
Chirurg. 39, 331 (1968)

Braren, F.
Vergleichende Untersuchungen am spontan descendierten Hoden bei einseitigem Kryptorchismus
Endokrinologie 38, 29 (1959)

Chalkley, H. W.
Method for the quantitative morphologic analysis of tissue
J. Nat. Concer Inst. 4, 47 (1943)

Clermont, Y.
Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: A revised model for the renewal of spermatogonia
Amer. J. Anat. 111, 111 (1962)

Cuorot, M.
M. T. Hochereau de Reviers
R. Ortavant
Spermatogenesis. In: The Testis, Vol. I, Eds. A. D. Johnson, W. R. Gomes and N. L. Vandemark. Academic. Press, New York (1970)

Döpfmer, R.
W. Nienaber
Die einseitige Hodendystopie (Kryptorchismus
Munch. med. Wochenschr. 46, 2096 (1964)

Glagoleff, A. A.
On the geometrical methos of quantitative mineralogic analysis of rocks
Trans. Inst. Econ. Min., Moskau, 59 (1933)
Zit. nach Sitte (1967)

Graf, U.
H. -J. Henning
K. Stange
Formeln und Tabellen der mathematischen Statistik
2. völlig neubearbeitete Auflage von K. Stange und H. -J. Henning
Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York 1969

Haug, H.
Die Treffermethode, ein Verfahren zur quantitativen Analyse im histologischen Schnitt
Zschr. Anat. Entwickl. -Gesch., 118, 302 (1955)

Haug, H.
Bedeutung und Grenzen der quantitativen Meßmethode in der Histologie
Med. Grundlagenforsch., 4, 299 (1962)

Hecker, W. CH.
Neue Gesichtspunkte zum Kryptorchismus-problem
Munch. Med. Wochenschr. 113, 1125 (1971)

Hecker, W. CH.
Neue Gesichtspunkte zum Kryptorchismus-problem
Med. Welt 23, 1476 (1972)

Hecker, W. CH.
H. A. Hienz
W. Mengel
Frühbehandlung des Maldescensus testis
Dtsch. med. Wochenschr. 97, 1325 (1972)

Hennig, A.
Kritische Betrachtungen zur Volumen- und Oberflächenmessung in der Mikroskopie
Zeiss Werkzeitschr. 30, 78 (1958)

Hennig, A. — Fehlerbetrachtung zur Volumenbestimmung aus der Integration ebener Schnitte
In: Quantitative Methoden in der Morphologie
Hersg. v. E.R. Weibel und W. Elias
Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York

Hilscher, W. — "Beiträge zur Orthologie und Pathologie der Spermatogoniogenese" der Ratte
Beitr. path. Anat. 130, 69 (1964)

Hilscher, W. — Persönliche Mitteilung (1973)

Hösli, P.O. — Zur Problematik der Behandlung des Kryptorchismus
Act. Urol. 2, 107 (1971) a)

Hösli, P. O. — Zum Kryptorchismus: Welches ist der optimale Zeitpunkt der Behandlung?
Schweiz. med. Wochenschr. 101, 1090 (1971)b)

Ibach, B. — Stadieneinteilung der normalen Spermatogenese des Hundes und Einbau von $^{3}$H-Thymidin in die Spermatozyten I des orthotopen Hodens bei experimentell unilateralem Kryptorchismus
Inaug. Diss. Bonn 1974

Knorr, D. — Die Hormontherapie der Retentio testis
Arch. klin. exp. Derm. 227, 707 (1966)

Knorr, D. — Testosteronproduktion
Dtsch. med. Wochenschr. 98, 1087 (1973)

Mönks, B.R. — Ergebnisse von Tubulusmessungen an Hoden puberaler Hunde unter verschiedenen Bedingungen des experimentellen unilateralen Kryptorchismus
Inaug. Diss. Bonn 1975

Nelson, W.O. — Some problems of testicular function
J. Urol. 69, 325 (1953)

Niermann, H. — Die Hodenretention aus der Sicht des Andrologen
Endokrinologischer Arbeitstag (1972)

Ortavant, R. — Spermatogenesis and Morphology of the Spermatozoon
In: Reproduction in Domestic Animals
Vol. II. Eds. H.H. Cole and P.T. Cupps.
Academic Press, New York (1959)

Roosen-Runge, E.C.
L.O. Giesel — Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat
Am. J. Anat. 87, 1 (1950)

Sachs, L. — Statistische Auswertungsmethoden
2. neubearbeitete und erweiterte Auflage.
Springer Verl. Berlin, Heidelberg,
New York 1969

Schirren, C. — Ergebnisse der Hodenhoschstandstherapie
Arch. klin. exp. Derm. 227, 726 (1968)

Scott, L.S. — Unilateral cryptorchidism: subsequent effects on fertility
J. Reprod. Fertil. 2, 54 (1961)

Shirai, M.
S. Matsushita
M. Kagayama
S. Ichijo
M. Takeuchi
Histological changes of the scrotal testis in unilateral cryptorchidism
Tohoku J. exp. Med. 90, 363 (1966)

Sitte, H.
Morphologische Untersuchungen an Zellen
In: Quantiative Methoden in der Morphologie
Hrsg. v. E. R. Weibel und W. Elias
Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York, 167 (1967)

Städtler, F.
Die normale und gestörte praepuberale Hodenentwicklung des Menschen
Inaug. Med. Habil. Homburg 1971

Städtler, F.
R. Hartmann
Histologische und morphometrische Untersuchungen zum praepuberalen Hodenwachstum bei normal entwickelten und zerebral geschädigten Knaben
Dtsch. med. Wschr. 97, 104 (1972)

Städtler, F.
Die normale und gestörte praepuberale Hodenentwicklung des Menschen
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1973

Straub, E.
Probleme des pathologischen Hodenhochstands
Monatsschr. Kinderheilkd. 117, 401 (1969)

Tonutti, E.
Über Strukturelemente des Hodens und ihr Verhalten unter experimentellen Bedingungen (Hypophysektomie und Substitution mit

Choriongonadotropin)
Symp. Dtsch. Ges. Endokrinol. 1, 146 (1953)

Weber, A. — Ein "quantitativer Lymphknotentest". Untersuchungen von Wistarratten nach intraperitonealer Gabe von quarzhaltigen Stäuben und Rutil
Inaug. Diss. Düsseldorf 1973

Weber, A.
W. Hilscher
H. Steiger
G. Gauß — Untersuchungen an Lymphknoten von Wistarratten nach i. p. Gabe von quarzhaltigen Stäuben und Rutil
Silikosebericht Nordrhein-Westfalen, Bd. 9, 149 (1973)
Verl. Glückauf Essen

Weißbach, L. — Histomorphometrische, autoradiographische und enzymhistochemische Untersuchungen am puberalen und postpuberalen Hundehoden unter den Bedingungen des experimentellen unilateralen Kryptorchismus mit und ohne HCG-Applikation
Inaug. Med. Habil. Bonn 1974

Wiese, U. — Histometrische Untersuchungen am präpuberalen Hundehoden beim experimentellen unilateralen Kryptorchismus
Inaug. Diss. Bonn 1974

Herrn Priv. Doz. Dr. L. Weißbach bin ich für die Überlassung des Themas sowie für die Hilfe bei der Durchführung der Tieroperationen zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. B. Ibach danke ich für die Unterstützung bei der Auswertung der histologischen Präparate.

## Lebenslauf

| | |
|---|---|
| 1942 | 24. 11. geboren in Duisburg |
| 1949 - 1958 | Volksschule |
| 1959 - 1962 | Lehre als Starkstromelektriker |
| 1963 - 1968 | Abendgymnasium in Duisburg |
| 1969 - 1970 | Studium an der Ruhruniversität Bochum, Fach Wirtschaftswissenschaften |
| WS 1970/71 | Immatrikulation an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, Fach Zahnmedizin |
| SS 1971 | Naturwissenschaftliche Vorprüfung |
| WS 1972/73 | Zahnmedizinische Vorprüfung |
| WS 1975/76 | Staatsexamen |